



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología**

**“Detección de *Phytophthora cinnamomi* en raíces de  
*Persea americana* "palto" por Nested-PCR”**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo, Microbiólogo  
Parasitólogo

**AUTOR**

Eddy ORTEGA RAMÍREZ

**ASESOR**

Pedro Luis CASTELLANOS SÁNCHEZ

Lima, Perú

2015

## RESUMEN

Esta investigación establece una metodología de detección de ADN de *Phytophthora cinnamomi* en muestras de raíces de *Persea americana* “palto” procedente del Sector III del Proyecto Especial CHAVIMOCHIC, La Libertad-Perú. Se estableció un protocolo de amplificación de regiones del espaciador transcrito interno (ITS) del ADNr por Nested-PCR, que permitió el diagnóstico rápido y confiable de *P. cinnamomi*. Los iniciadores PPF/PPR específicos del orden Pythiales se emplearon en la primera reacción de PCR (Simple-PCR), mientras que los iniciadores PcinnF/PcinnR específicos de *P. cinnamomi* se usaron en la segunda reacción de PCR (Nested-PCR). La estandarización de las pruebas de amplificación se realizó a partir de ADN extraído de micelio en cultivo puro de la cepa FM2C1R1 aislada previamente de la zona de estudio. Se obtuvieron amplificaciones del ADNr de *P. cinnamomi* por Simple-PCR desde 100 pg de ADN extraído de raíces; mientras que en Nested-PCR fue posible desde los 10 pg del ADN previamente amplificado. El método de extracción y amplificación a partir de ADN de raíces fue suficientemente sensible para detectar al patógeno sin necesidad de mayores purificaciones del ADN extraído. La dilución del ADN extraído o el incremento de la concentración de  $MgCl_2$  en la reacción no mejoran considerablemente la visualización de amplicones. De un total de 30 muestras de raíces de palto analizadas en el área de estudio, 22 resultaron positivas para el patógeno en Nested-PCR. La confiabilidad de la Nested-PCR fue verificada mediante secuenciación de los productos de amplificación y análisis filogenético. Esta investigación fue la primera en establecer una metodología de detección de ADN de *P. cinnamomi* en raíces de palto y proporciona una herramienta molecular aplicable para la prevención y monitoreo del patógeno en el cultivo de palto.

Palabras claves: Oomycete, Pythiales, *Phytophthora cinnamomi*, *Persea americana*, Nested-PCR, muerte regresiva.

## ABSTRACT

This research evaluates the detection of DNA in samples of *Phytophthora cinnamomi* in *P. americana* "avocado" roots from Sector III of the Special Project CHAVIMOCHIC, La Libertad-Perú. An amplification protocol of the Internal Transcribed Spacer (ITS) regions rDNA was established, which enables fast and reliable diagnosis of *P. cinnamomi*. The PPF/PPR specific primers for the Order Pythiales were used, for first reaction of PCR (Single-PCR), while specific primers PcinnF/PcinnR were used in *P. cinnamomi* for Nested-PCR. Optimization of testing amplification was performed from DNA extracted from pure culture mycelium of strain FM2C1R1 previously isolated from the study area. PCR amplification of *P. cinnamomi* ITS1 rDNA gene regions for Single-PCR with primers PPF/PPR was obtained from 100 µg of DNA extracted from roots, while in Nested-PCR with the primers PcinnF/PcinnR, was amplification was possible from 10 µg from previously extracted DNA. The method of extraction and amplification of DNA from roots was sufficiently sensitive to detect the pathogen without further purification of the extracted DNA. Dilutions of the extracted DNA or increasing MgCl<sub>2</sub> concentration in the reaction did not significantly enhance visualization of amplicons. A total of 30 samples of avocado roots were analyzed in the study area, 22 were positive for the pathogen in Nested-PCR. The reliability of Nested-PCR was verified by sequencing of the amplified products and phylogenetic analysis. This research was the first one to establish a methodology for DNA detection of *P. cinnamomi* in avocado roots and provide a molecular tool applicable to the prevention and monitoring of the pathogen in avocado cultures.

Keywords: Oomycete, Pythiales, *Phytophthora cinnamomi*, *Persea americana*, Nested-PCR, dieback.